

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

Über die Reaktion des Virus N mit einem
Seruminhibitor

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Peter Ingwersen
Tierarzt aus Niebüll

Gießen 1970

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

Über die Reaktion des Virus N mit einem Seruminhibitor

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Peter Ingwersen
Tierarzt aus Niebüll

Gießen 1970

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Prof. Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Dezember 1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Aviäre Influenzaviren	2
III. Serum-inhibitoren der Myxoviren	7
IV. Material und Methoden	12
1. Virusstämme	12
2. Seren	14
3. Embryonale Hühnerzellen	15
4. Plaquetest	15
5. Hämagglutinationsreaktion	16
6. Hämagglutinationshemmungsreaktion	16
7. Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität	16
8. Neuraminidase-Hemmungsreaktion	17
9. Äther-Tween-Spaltung	18
V. Untersuchungsergebnisse	19
1. Einfluß von Seren verschiedener Spezies auf die Hämagglutinationsfähigkeit des Virus N	19
2. Nachweis der Inhibitoraktivität in der α_2 -Fraktion der Serumglobuline	21
3. Untersuchungen zur Virusspezifität des Inhibitors	26
a) Charakterisierung der verwendeten aviären Influenzaviren	27
b) Einfluß des Serum-inhibitors auf die Hämagglutination anderer aviärer Influenza A-Viren	29

4. Versuche zur Identifizierung der Inhibitor-sensitiven Viruskomponente	32
a) Neuraminidase	32
b) Hämagglutinin	35
c) Normalkomponente	37
VI. Besprechung der Ergebnisse	42
VII. Zusammenfassung	48
VIII. Literaturverzeichnis	49

Lebenslauf

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Im Serum von Mensch und Tier können proteinhaltige Substanzen vorhanden sein, die die biologischen Eigenschaften von Viren zu beeinflussen vermögen. Diese als Seruminhibitoren bezeichneten Serumbestandteile unterscheiden sich u.a. dadurch von Antikörpern, als sie nicht durch Stimulation eines Antigens erworben werden. Sie stellen in ihren physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften keine einheitliche Substanz dar. Man teilt sie in der Regel ein nach Art der Viren, gegen die sie wirksam sind, nach Art des durch sie gehemmten biologischen Vorganges und schließlich auch nach stofflichen Kriterien. Aufgrund ihrer Eigenschaften werden die Seruminhibitoren der Myxoviren in vier verschiedene Typen unterteilt und als α , β -, γ - bzw. C-Inhibitoren bezeichnet (vergl. Křižanová u. Rathová, 1969).

Von Berg und Babiker (1969) wurde ein in Kälberseren vorkommender gegen die Hämagglutination und die Infektiosität des Virus N gerichteter Seruminhibitor beschrieben und den α -Inhibitoren zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit soll dieser Inhibitor weiter charakterisiert werden. Es interessierte vor allen Dingen seine Virusspezifität. Dabei sollte sein Verhalten gegenüber den in den letzten Jahren nachgewiesenen aviären Influenzaviren geprüft werden. Daneben wurde versucht, die mit dem Inhibitor reagierenden Viruskomponenten zu erfassen. Von den Untersuchungen wurden Hinweise über die Wechselwirkungen zwischen dem Virus N und seinen Rezeptoren erwartet.

• II. AVIÄRE INFLUENZAVIREN

In letzter Zeit wurden in zunehmendem Maße aviäre Influenzaviren isoliert, die aufgrund ihres antigenen Verhaltens in die Influenza A-Untergruppe eingeordnet werden.

Die zur Influenza A-Untergruppe gehörenden Virusarten besitzen folgende Eigenschaften: Die infektiösen Viruspartikel sind in der Regel kugelförmig mit einem Durchmesser von etwa 1000 Å. Sie enthalten in ihrem Innern eine aus Ribonucleinsäure und Protein bestehende Komponente, die Träger der genetischen Information der Viruspartikel ist und als Ribonucleoprotein-(RNP)-Antigen bezeichnet wird. Das RNP-Antigen wird von einer Außenhülle umgeben, auf der die hämagglutinierende und immunogene Komponente sowie ihre Neuraminidase lokalisiert sind. Die Neuraminidase ist ein Enzym, das aus neuraminsäurehaltigen Substraten (z.B. einigen Glycoproteinen) N-Acetylneuraminsäure abspaltet. Die Antigene des Hämagglutinins und der Virus-Neuraminidase sind weitgehend stammspezifisch (Davenport, Rott u. Schäfer, 1960; Drzeniek, Seto u. Rott, 1966). Diese virusspezifischen Komponenten der Außenhülle werden durch wirtsspezifisches Material zusammengehalten. Das wirtsspezifische Material, das allgemein als Normalkomponente bezeichnet wird, ist ein integrierter Bestandteil der Viruspartikel. Seine Entfernung führt zu ihrer Desintegration (vergl.

Rott et al., 1966). Im Gegensatz zu den Komponenten der Außenhülle zeigen die RNP-Antigene der zur Influenza A-Untergruppe gehörenden Viren eine enge serologische Verwandtschaft (Lief, Fabiyi u. Henle, 1958; Davenport, Rott u. Schäfer, 1960). Durch geeignete Verfahren lassen sich diese virusspezifischen Einheiten voneinander trennen (vergl. Rott, Drzeniek u. Frank, 1970).

Aufgrund ihres antigenen Verhaltens werden nach Pereira die aviären Influenza A-Viren in 6 Gruppen eingeteilt. Dabei wird ihr Verhalten in der Hämagglutinations- und Neuraminidase-Hemmungsreaktion, der Komplementbindungsreaktion und des Serumneutralisationstestes berücksichtigt. Die repräsentativen Vertreter der verschiedenen Gruppen sind in Tab. 1 aufgeführt. Pereira et al. (1966) schließen aus ihren Untersuchungen, daß eine scharfe Trennung durch serologische Tests oft kaum möglich ist. Es bestehen sogenannte Antigenbrücken zwischen einzelnen Stämmen wie es die Kreuzreaktionen wiedergeben. Wie alle Influenza A-Viren, so zeigen auch die aviären Influenzaviren eine große Neigung zur Variantenbildung. Es wird allgemein angenommen, daß dieses Verhalten der Influenzaviren aus einer Wechselwirkung zwischen der Mutabilität des Virions und dem selektiven Druck durch immune Wirtspopulationen, dem das Virus ausgesetzt ist, resultiert.

Tabelle 1

Serologische Gruppierung der aviären Influenzaviren

(nach Pereira, 1969)

Gruppe	Stamm
1	FPV, T/Eng/63
2	Virus N, Quail/It/1117/65
3	Duck/Eng/56
4	Duck/Czech/56, Duck/Eng/62
5	Ch/Scotland/59, Tern/SA/61
6	T/Can/63, T/Mass/65

So zeigen Pereira et al. (1966) zum Beispiel, daß zwischen T/Can/63, T/Mass/65 und Duck/Czech/56 in der Komplementbindungsreaktion Verwandtschaftsbeziehungen bestehen. Das gleiche gilt für das Virus N und die von Rinaldi et al. (1967a,b; 1968a,b) in Oberitalien isolierten Stämme. Um einen Virusstamm gruppieren sich mehrere sehr nahe verwandte Stämme und es kommen zu den z.Zt. mehr als 50 bekannten aviären Influenza A-Stämmen immer neue hinzu, so daß eine Unterteilung der aviären Influenzaviren in die genannten Antigengruppen nur ein gewisses orientierendes System darstellen kann.

Es wird vermutet, daß die aviären Influenzaviren eine gewisse Rolle als Virus-Reservoir für die menschlichen Influenzaviren spielen könnten. In diese Richtung weisen auch Untersuchungsergebnisse von Pereira (1969), der eine Verwandtschaft zwischen dem aviären Influenzastamm A/T/Mass/65 und dem menschenpathogenen Stamm A2/Sing/57 feststellte, wobei die Antigenkomponente, die in beiden Stämmen gleich ist, hauptsächlich die Neuramidase darstellt. Pereira versucht diese serologische Verwandtschaft zu erklären, indem er nicht ausschließt, daß der menschenpathogene A2-Stamm von einem aviären Influenzavirus abstammt und sich im Laufe der Zeit durch immunologische Selektion von diesem Virus entfernt hat. Die Befunde von Delay et al. (1967), denen es gelungen

war, ein geflügelpestähnliches Virus von einem an einer Hepatitis erkrankten Menschen zu isolieren und damit Kücken zu infizieren, unterstützen Pereiras Hypothese. Rott und Schäfer (1960) kamen schon früher bei ihren Untersuchungen über das Virus N zu ähnlichen Annahmen.

Serologische Verwandtschaften werden auch zwischen Pferde- und Schweineinfluenzaviren auf der einen Seite und aviären Influenzaviren auf der anderen Seite beschrieben (Pereira, 1969). So soll eine antigene Verwandtschaft bestehen zwischen dem Pferdeinfluenzavirus Eq 1/Prague/56 und dem Virus der Klassischen Geflügelpest bzw. dem Virus A/T/Eng/63 und dem Pferdeinfluenzavirus Eq 2/Miami/63 und A/T/Can/63 als auch zwischen dem Schweineinfluenzavirus Swine/S15/30 und Ch/Scotland/59. Aufgrund dieser Befunde haben die aviären Influenzaviren über die Veterinärmedizin hinaus eine große epidemiologische Bedeutung.

III. SERUMINHIBITOREN DER MYXOVIREN

Wie bereits erwähnt, lassen sich die Seruminhhibitoren der Myxoviren aufgrund ihrer physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften in vier verschiedene Typen aufteilen. Die Bezeichnung α -, β -, γ - und C-Inhibitoren wurde gewählt, als es klar wurde, daß nicht eine wohldefinierte Substanz, sondern vielmehr Substanzklassen verschiedener Natur virushemmende Eigenschaften besitzen. Die wichtigsten Merkmale der α -, β - und γ -Inhibitoren sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Der C-Inhibitor ist ausschließlich gegen die sehr selten auftretenden Influenza C-Viren gerichtet (Styk, 1955). Über seine Natur ist nur sehr wenig bekannt. Es scheint, daß er in seinen chemischen Eigenschaften weitgehend den α - und γ -Inhibitoren entspricht, d.h. ein Glycoprotein darstellt.

Die α -Inhibitoren, oder nach dem Entdecker auch Francis-Inhibitoren genannt, sind thermostabile hochmolekulare Glycoproteine, die als aktive Gruppe Sialinsäure besitzen. Ihre Aktivität wird durch Virus- und Vibrio cholerae Neuraminidase und durch Perjodat zerstört. Ihr Verhalten gegenüber Trypsin und anderen proteolytischen Enzymen ist unterschiedlich. Chemisch gesehen sind sie

Tabelle 2

Eigenschaften der Seruminhibitoren

(nach Křižanová u. Rathova, 1969)

	Inhibitoren		
	α	β	γ
Zerstörung durch Hitze	-	+	-
Hemmung der HA durch natives Virus	-	+	+
Hemmung der HA durch Indikatorvirus	+	+	+
Inaktivierung des Inhibitors durch Neuraminidase	+	-	-
Inaktivierung des Inhibitors durch Trypsin	+	+	+
Inaktivierung des Inhibitors durch Kaliumperjodat	+	-	+
Neutralisation der Infektiosität	-	+	+
gehemmte Influenzavirus-Stämme	A; A ₁ ; A ₂ ; B	A; A ₁	A ₂
Vorkommen der Inhibitoren in Seren von	verschiedenen Tierarten	Rind Maus Kaninchen Frettchen	Mensch Pferd Meerschweinchen Kaninchen Frettchen
chemische Zusammensetzung	Glycoprotein	Protein	Glycoprotein

keine einheitlichen Verbindungen. So besitzt der im Ovomucin vorkommende Inhibitor 26% Polysaccharide und 73% Proteine (Kozinski u. Mikulaszek, 1951). Er soll etwa 200 Polysaccharidgruppen enthalten. Demgegenüber besteht das Schafsubmaxillaris-Glycoprotein aus 41% Kohlenhydrat, das etwa 800 Disaccharideeinheiten enthalten soll (Gottschalk, 1964).

Die Inhibitoraktivität ist abhängig von dem Molekulargewicht des Inhibitors (Gottschalk, 1960; Springer, 1967). Darauf weisen auch die Untersuchungsergebnisse von Berg und Babiker (1969) hin. Sie konnten zeigen, daß die Aktivität des gegen das Virus N gerichteten Kälberserum-Inhibitors nach Polymerisation stark ansteigt. Fazekas de St. Groth und Gottschalk (1963) nehmen an, daß die Inhibitoraktivität von der Anzahl der Sialinsäurereste am Glycoprotein abhängt, die gleichzeitig an komplementäre Gruppen der Virusoberfläche gebunden werden können.

Die α -Inhibitoren lassen sich relativ leicht durch ihre Fähigkeit bestimmen, die Hämagglutination von Influenzaviren zu inhibieren, die für 30 Minuten auf 56° C erhitzt wurden (Indikatorvirus). Aktives Virus wird nicht inhibiert. Es wird angenommen (Stone, 1949), daß die Hämagglutination des Indikatorvirus deshalb gehemmt wird, weil durch die Erhitzung die Virus-Neuraminidase zerstört und

dadurch der Inhibitor während der Reaktion nicht abgebaut wird. Im Gegensatz zu den Befunden anderer Autoren konnten Babiker und Rott (1968) sowie Berg und Babiker (1969) mit einem in Kälberseren vorhandenen α -Inhibitor neben der Hämagglutination auch die Infektiosität eines Influenzavirus (Virus N) beeinflussen. Die Diskrepanz der Befunde läßt sich am einfachsten auf die unterschiedlichen Methoden zurückführen, die zur Prüfung der neutralisierenden Aktivität des Inhibitor verwendet wurden.

Über die chemische Natur der β - oder Chu-Inhibitoren ist nur wenig bekannt. Es spricht einiges dafür, daß es sich bei ihnen um Proteine handelt. Sie sind thermolabil und werden durch Trypsin, nicht aber durch Perjodat oder Neuraminidase zerstört. Es überrascht daher auch nicht, daß sie in der Lage sind, die Hämagglutination von aktivem Virus und die Infektiosität zu hemmen. Ca-Ionen spielen bei der Wirkung der β -Inhibitoren eine wichtige Rolle. Bei Calcium-Entzug dissoziiert das Inhibitormolekül und verliert seine Aktivität (Krizanova et al., 1963, 1966).

Der γ -Inhibitor (Shimajo et al., 1958) reagiert selektiv mit inhibitorsensitiven Stämmen des Influenza A₂-Virus (vergl. Cohen u. Belyavin, 1959; Cohen, Newland u. Biddle, 1963). Er ist hitzestabil und wird durch Perjodat, nicht jedoch durch Neuraminidase inaktiviert. Er stellt daher

offensichtlich, ähnlich wie der α -Inhibitor, ein Glycoprotein dar. Über die inhibitoraktive Gruppe ist noch nichts bekannt. Der γ -Inhibitor ist in der Lage, sowohl die Hämagglutination als auch die Infektiosität von aktiven Influenza A₂-Viren zu hemmen.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Virusstämme

a) Klassische Geflügelpest (KP)

Eipassage des Stammes "Rostock".

b) Virus N

Eipassage eines von Prof. Hallauer, Bern, überlassenen Stammes (Rott u. Schäfer, 1960).

c) Die Stämme A/Turk/Eng/66 (Wannop), KP-Dutch, A/Turk/Mass/65, A/Turk/Eng/63 (Langham), A/Ch/Scotl./59 (Wilson), A/Turk/Can/63 (Wilmot), KP-Brescia, A/Wimor/65 und Tern/SA/61.

Die Virusstämme wurden uns von Dr. Kendal, London, zur Verfügung gestellt und wurden in Eipassagen fortgeführt.

Mit den infektiösen Viruspartikeln aller verwendeten Virusstämme wurden 11 Tage lang bebrütete Eier nach der üblichen Methode beimpft und die infektiöse Eiflüssigkeit aus Amnion- und Allantoishöhle nach einer bestimmten, aus der Tab. 3 zu ersehenden Zeit gewonnen. Die Eiflüssigkeiten wurden durch Zentrifugation bei 2200 g vorgeklärt und durch Ultrazentrifugation bei ρ (Giebler, 1958) 7,5 gereinigt und konzentriert. Die Chorioallantoismembranen

Tabelle 3

Bebrütungsdauer der mit aviären Influenzaviren infizierten

Bruteier

Virusstamm	Bebrütungszeit nach der Infektion in Stdn.
A/Turk/Eng/66 "Wannop"	36
KP "Dutch"	24
A/Turk/Mass/65	36
A/Turk/Eng/63 "Langham"	28
A/Ch/Scotl./59 "Wilson"	48
A/Turk/Can/63 "Wilmot"	36
KP "Brescia"	28
A/Wimor/65	36
Tern/SA/61	28
N	48

(Eihäute) wurden nach der Entnahme dreimal in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,2, gewaschen und zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

2. Seren

An Seren verwendeten wir: Kälberserum der Behringwerke AG, Marburg, Pferdeserum von der Chirurgischen Klinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen, Kaninchen- und Hühnerseren aus institutseigenen Tierbeständen sowie Serum von Menschen vom Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen.

Zur Gewinnung von Virus N-Antiserum stellten wir ein Virus N-Alaunpräzipitat her, indem wir zu hochgereinigtem Virus N-Konzentrat mit 15 000 hämagglutinierenden Einheiten tropfenweise ein gleiches Volumen 5%iges Alaun gaben. Diese Mischung (2 ml) injizierten wir (je 0,5 ml-Depots) in den Brustmuskel eines Hahnes. Nach 4 Wochen wurde der Hahn durch eine gleiche Behandlung nochmals geimpft und nach weiteren 8 - 10 Tagen durch Herzpunktion Blut entnommen. Der Hämagglutinationshemmungstiter betrug 2^{-10} .

Alpha₂ und Gamma-Rinderglobulinfraktionen sowie Rinderserumalbumin bezogen wir von den Behringwerken AG, Mar-

burg, Alpha-Rinderglobuline von der Firma Serva in Heidelberg.

3. Embryonale Hühnerzellen

Für das Anzüchten von Hühnerfibroblasten wurde die Methode von Kraus und Schäfer (1963) angewandt. Die sterilen Petrischalen (Durchmesser 5 cm) wurden mit 5×10^6 Zellen beschickt. 24 Stunden später konnten die Kulturen infiziert werden.

4. Plaquetest

Zur Bestimmung der Infektiosität wurden Hühnerfibroblastenkulturen mit isotonischer, gepufferter NaCl-Lösung, pH 7,2, einmal gewaschen und mit den zu testenden Virusverdünnungen beschickt. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten bei 37° C wurden die infizierten Kulturen mit einem 0,7% Agar enthaltenden Nährmedium überschichtet (Schäfer, Zimmermann, Schuster, 1959) und nach 2 Tagen mit Neutralrot gefärbt. Die ungefärbten Nekroseherde (Plaques) konnten dann ausgezählt werden.

5. Hämagglutinationsreaktion

Die Hämagglutinationsreaktion wurde nach der üblichen Standardmethode durchgeführt (vergl. Davenport, Rott u. Schäfer, 1960). 0,4 ml nach Zweierpotenzen verdünntem hämagglutinierendem Material wurden 0,4 ml einer 1%igen Hühnererythrozytensuspension zugegeben. Die Reaktion wurde nach 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur abgelesen.

6. Hämagglutinationshemmungsreaktion

Bei der Hämagglutinationshemmungsreaktion wurde im Prinzip die für die Diagnose der Influenza allgemein empfohlene Methode angewandt. Zu 0,2 ml in Zweierpotenzen verdünnter Serumlösung wurden 0,2 ml 8 hämagglutinierende Einheiten enthaltendes hämagglutinierendes Material zugegeben und die Mischung 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,4 ml einer 1%igen Hühnererythrozytensuspension zugefügt, nach 45 Minuten langem Stehen bei Raumtemperatur konnte die Reaktion abgelesen werden.

7. Bestimmung der Neuraminidase-Aktivität

Die Neuraminidase-Aktivität wurde nach der von Drzeniek, Seto und Rott (1966) angegebenen Methode bestimmt. Das

Virusmaterial wurde über Nacht gegen isotonen Phosphatpuffer, pH 7,0, bei 4° C dialysiert und in entsprechenden Verdünnungen mit Rindersialolactose 15 Minuten bei 37° C in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, inkubiert. Das Testvolumen betrug 0,5 ml, die Substratmenge 100 µg Rindersialolactose. Die freigesetzte N-Acetylneuraminsäure wurde mit Hilfe des Thiobarbitursäuretestes nach Aminoff (1961) bestimmt. Die Enzymaktivität wird angegeben als die Menge an N-Acetylneuraminsäure, ausgedrückt in µg NANS pro 0,5 ml Testvolumen, welche von 1 ml des dialysierten Virusmaterials in 15 Minuten unter den angegebenen Bedingungen abgespalten wird.

8. Neuraminidase-Hemmungsreaktion

Die Neuraminidase-Hemmung wurde ausgeführt, indem wir von einer Standardmenge an Viruskonzentrat ausgingen, die 10 µg Sialinsäure aus Fetuin in 15 Minuten bei 37° C und pH 6,0 abspaltet. Die Enzymmenge entspricht 2×10^{-3} Einheiten (Drzeniek, Seto u. Rott, 1966). Für die Hemmungsreaktion benutzten wir 0,1 ml Virus N-Antiserum in den Verdünnungen 1 : 10, 1 : 100 und 1 : 1000. Der Prozentsatz der Hemmung wurde in dem Unterschied zwischen der Aktivität der Kontrolle zum Testmaterial festgestellt.

9. Äther-Tween-Spaltung

Sie wurde nach der von Rott (1965) beschriebenen Methode ausgeführt. Zwei ml Viruskonzentrat wurden mit Phosphatpuffer auf 10 ml verdünnt, mit 1,25 mg/ml Tween 80 und 5 ml peroxydfreiem Äther versetzt und anschließend bei 4° C kräftig geschüttelt. Danach wurde das Material 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Äther wurde aus der Wasserphase mit Hilfe von Stickstoff ausgetrieben. Nichtdurchgespaltene Virusteilchen wurden dann in der Ultrazentrifuge bei einem Leistungsindex von π 7,5 abzentrifugiert. Die Überstände enthielten das Hämagglutinin.

V. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

1. Einfluß von Seren verschiedener Spezies auf die Hämagglutinationsfähigkeit des Virus N

Wie bereits erwähnt, fanden Berg und Babiker (1969) in Kälberseren einen Inhibitor, der die Hämagglutination von Virus N im Indikatorvirus-Zustand zu hemmen vermag. Es war nun interessant, zu prüfen, ob dieser Inhibitor auch in Seren anderer Tierarten vorkommt. Geprüft wurden neben einigen Seren von Kälbern verschiedener Rasse auch Seren vom Rind, Schaf, Hund, Huhn, Kaninchen, Pferd und Schwein. Die Seren wurden 1 : 8 mit Phosphatpufferlösung nach Dulbecco und Vogt (1954), pH 7,2, (PBS) verdünnt, für 30 Minuten auf 90° C erhitzt und anschließend auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der Hämagglutination des für 30 Minuten auf 56° C erhitzten Virus N getestet.

Tabelle 4 zeigt, daß eine dem Kälberserum vergleichbare Inhibitoraktivität nur im Rinderserum nachzuweisen war. Sie konnte zwar auch in Seren von Hammel, Huhn, Hund und Kaninchen gefunden werden, jedoch mit deutlich geringeren Hemmungstitern. In den von uns verwendeten Seren von Pferd und Schwein ließ sich keine Inhibitoraktivität feststellen.

Tabelle 4

Untersuchungen über die Anwesenheit eines Serum-inhibitors in
Seren verschiedener Herkunft

Serum (erhitzt 30 Min. auf 90° C)	Hämagglutinationshemmungs- titer gegen Indikatorvirus N*
3 Kälber (schwarz-buntes Vieh)	16 000
Kalb (Braunvieh)	16 000
Kalb (Fleckvieh)	16 000
Rind	4 000
Lamm	128
Hund	64
Kaninchen	16
Pferd	< 2
Schwein	< 2

* angegeben sind die reziproken Hämagglutinationshemmungstiter

Daß es sich bei den in den verschiedenen Seren nachgewiesenen Inhibitoren gegenüber dem Virus N um analoge Substanzen handelt, geht aus Versuchen hervor, bei denen die Seren verschiedenen chemischen Einflüssen ausgesetzt wurden. So ließen sich die Inhibitoren in allen positiven Seren durch 90 Minuten langes Behandeln mit 160 Einheiten V. cholerae Neuraminidase pro ml sowie durch 40 Minuten langes Behandeln mit einer m/100 KJO₄-Lösung zerstören. Diese Befunde weisen darauf hin, daß es sich bei allen nachgewiesenen Serum-Inhibitoren um sialinsäurehaltige Polysaccharide handelt. Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob am Aufbau der Inhibitoren auch Proteine beteiligt sind, wurden die Seren mit Trypsin (1 mg/ml) behandelt. Da durch diese Behandlung die Inhibitoren ebenfalls ihre Aktivität verloren haben, müssen an ihrem Aufbau neben Polysacchariden auch Proteine beteiligt sein.

2. Nachweis der Inhibitoraktivität in der α_2 -Fraktion der Serumglobuline

Biddle und Shortridge (1967) meinen, daß die α -Inhibitoren der Myxoviren zur Hauptsache in der alpha-Fraktion der Serumglobuline zu finden sind. Zur weiteren Charakterisierung des im Kälberserum gegen das Virus N gefundenen α -Inhibitors wurde geprüft, ob dieser ebenfalls in dieser Globulinfraktion nachzuweisen ist. Die Möglichkeit einer

Abtrennung des Serum-inhibitors von der gamma-Globulinfraktion wäre insofern bedeutungsvoll, als die Beeinflussung von serologischen Testen dadurch verhindert werden könnte.

Für diese Versuche wurden Eiweißfraktionen aus Rinderserum auf ihre Fähigkeit geprüft, die Hämagglutination von Virus N zu inhibieren. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt. Daraus geht hervor, daß die Hämagglutination von für 30 Minuten auf 56° C erhitztem Virus N (Indikatorvirus) durch alpha-Globuline gehemmt wird. Rinderserumalbumin und gamma-Globuline dagegen haben keinen Einfluß auf die Hemmung der Hämagglutination dieser Viruspräparation.

Wie beim Vollserum wird auch durch die alpha-Globulinfraktion nur die Hämagglutination von Indikatorvirus, nicht dagegen die von nativem Virus gehemmt.

Der in der alpha-Fraktion vorhandene Inhibitor gleicht in seinem Temperaturverhalten dem bereits von Berg und Babiker beschriebenen im Vollserum vorkommenden Serum-inhibitor. Wie bei diesem steigen die Hämagglutinationshemmungstiter beim Erhitzen auf 90° C um das 16 - 32fache an. Selbst nach 5 Stunden langem Kochen blieb die Inhibitoraktivität erhalten.

Tabelle 5

Reaktion des Virus N mit Eiweißfraktionen aus Rinderseren

Eiweißfraktionen		Hämagglutinationshemmungstiter *	
		natives Virus N	Indikatorvirus N
nicht erhitzt	Albumin	< 8	< 8
	alpha-Globulin	< 8	1 000
	gamma-Globulin	< 8	< 8
erhitzt 30 Min. 90° C	Albumin	< 8	< 8
	alpha-Globulin	< 8	8 000
	gamma-Globulin	< 8	< 8

* angegeben sind die reziproken Hämagglutinationshemmungstiter

Seine Aktivität wird durch Behandlung des alpha-Globulins mit Neuraminidase und Kaliumperjodat zerstört. Für die entsprechenden Versuche wurde die alpha-globulinhaltige Lösung 1 : 8 mit PBS verdünnt und eine Stunde auf 100° C erhitzt. Bei der Behandlung mit Kaliumperjodat wurde das alpha-Globulin anschließend zu gleichen Teilen mit steigenden Konzentrationen einer KJO_4 -Lösung versetzt, das Gemisch 40 Minuten bei Raumtemperatur gehalten und schließlich die Reaktion durch Zugabe einer 1%igen Glycerinlösung abgestoppt. Bei den Versuchen mit Neuraminidase wurden zum alpha-Globulin gleiche Teile *Vibrio cholerae*- Neuraminidase (160 Einheiten/ml) gegeben und das Gemisch für 90 Minuten bei 37° C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktion durch 30 Minuten langes Kochen abgestoppt. Als Kontrollen dienten alpha-globulinhaltige Proben, denen anstelle von KJO_4 bzw. Neuraminidase PBS zugesetzt wurde. Die in Tab. 6 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß der in der untersuchten alpha-Globulinfraction vorhandene Inhibitor durch Neuraminidase und Kaliumperjodat zerstörbar ist.

Es ist daher mit größter Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß der von Berg und Babiker (1969) erfaßte Serum-inhibitor mit dem von uns in der alpha-Globulinfraction nachgewiesenen identisch ist. Zur weiteren Charakteri-

Tabelle 6

Verhalten der Inhibitoraktivität in der alpha-Serumglobulinfraktion vom Rind gegenüber Kalium-
perjodat und Neuraminidase *

	KJO ₄ -Konzentration					Behandlung mit Neuraminidase	
	m/100	m/200	m/400	m/800	m/1000	+	** -
α -Globulin "Serva"	<8	<8	<8	2000	4000	<8	4000
α_2 -Globulin "Behring"	<8	<8	1000	4000	8000	<8	8000
							Kontrolle

* angegeben sind die reziproken Hämagglutinationshemmungstitern

**+ behandelt, - nicht behandelt

sierung dieses Inhibitors verwendeten wir eine hochgereinigte alpha₂-Globulinfraktion vom Rind, die uns dankenswerterweise von Herrn Dr. Schwick, Behringwerke AG, Marburg, zur Verfügung gestellt wurde. Diese Präparation war wie die zuerst verwendete alpha-Globulinfraktion in der Lage, die Hämagglutination von Indikatorvirus N zu hemmen. Für die Hemmung war eine Proteinkonzentration von 3 µg/ml notwendig. Auch dieser Inhibitor war hitzestabil und neuraminidase- sowie perjodatlabil.

3. Untersuchungen zur Virusspezifität des Inhibitors

Ein wesentliches Charakteristikum von Serum-inhibitoren stellt ihre Virusspezifität dar. Berg und Babiker (1969) haben bereits gezeigt, daß der im Kälberserum nachgewiesene Inhibitor gegen das Virus N nicht mit dem menschlichen Influenza A-Stamm A2/Singapore und nicht mit den Viren der klassischen und atypischen Geflügelpest reagiert. Das bedeutet sicherlich, daß sich das Virus N in seinen strukturellen Eigenschaften von den anderen untersuchten Myxoviren unterscheidet. Sollte jedoch die Wirtsspezifität der Viren ihren Ausdruck in einer Analogie ihrer Oberflächenstruktur finden, wäre es denkbar, daß gewisse aviäre Influenzaviren wie das Virus N mit dem Inhibitor reagieren.

a) Charakterisierung der verwendeten aviären Influenza-
viren

Für die Untersuchung zur Virusspezifität des Inhibitors war es zunächst wichtig, Aufklärung über die strukturellen Eigenschaften der Oberfläche der verwendeten Virusarten zu erhalten. Geprüft wurde jeweils das antigene Verhalten des Virus-Hämagglutinins und der Neuraminidase gegenüber einem spezifischen Virus N-Antiserum. Dabei wurde festzustellen versucht, inwieweit sich die Hämagglutination und die Neuraminidase-Aktivität durch heterologes Antiserum beeinflussen lassen. Aus Tab. 7 geht hervor, daß zwischen den Hämagglutininen der verschiedenen aviären Influenzastämme und dem des Virus N keine antigene Verwandtschaft besteht. Interessanterweise entspricht die Antigenstruktur der Neuraminidase des Virusstammes KP "Dutch" jedoch derjenigen des Virus N, da sich die Enzymaktivität beider Stämme durch Virus N-Antiserum hemmen ließ. Dieser Befund ist ein weiterer Beweis dafür, daß das Hämagglutinin und die Neuraminidase bei den Influenzaviren zwei verschiedene Komponenten sind, die gegebenenfalls ausgetauscht werden können.

Um Aufschluß über die Wirtsspezifität der verschiedenen aviären Influenza A-Viren zu erhalten, wurde ihr Plaquebildungsvermögen in embryonalen Hühnerzellen unter-

Tabelle 7

Antigene Beziehungen der aviären Influenzaviren zum Virus N

Virusstamm	Hämagglutinationshemmungstiter* von			Neuraminidasehemmung in %
	N-Antiserum	Kälberserum nicht erhitzt	Kälberserum erhitzt 30' 90° C	
A/Turk/Eng/66 "Wannop"	< 8	1 000	16 000	0
KP "Dutch"	< 8	< 8	< 8	95,3
A/Turk/Mass/65	< 8	< 8	< 8	0
A/Turk/Eng/63 "Langham"	< 8	< 8	< 8	0
A/Ch/Scotl./59 "Wilson"	< 8	< 8	< 8	0
A/Turk/Can/63 "Wilmet"	< 8	< 8	< 8	0
KP "Brescia"	< 8	< 8	< 8	0
A/Wilmor/65	< 8	< 8	< 8	0
Tern/SA/61	< 8	< 8	inkomplett	0
"N"	2 000	1 000	16 000	98,7

* angegeben sind die reziproken Hämagglutinationshemmungstiter

sucht. Wie Tab. 8 zeigt, sind von den untersuchten Virusarten nur die der Stämme KP/Dutch, A/Turk/England/63, KP/Brescia, Tern/SA/61 und KP/Rostock in der Lage, im gewählten Gewebekultursystem Plaques zu bilden. Bei allen Plaque-positiven Stämmen nahm die Plaquezahl nahezu proportional mit der Virusverdünnung ab, was als Zeichen dafür gewertet werden darf, daß ein Plaque durch ein einzelnes im verimpften Material enthaltenes infektiöses Virus hervorgerufen wird. Das Verhältnis aus Plaque-bildenden und hämagglutinierenden Einheiten lag bei allen Plaque-bildenden Stämmen in der gleichen Größenordnung.

b) Einfluß des Seruminhibitors auf die Hämagglutination anderer aviärer Influenza A-Viren

Für die entsprechenden Versuche wurden die verwendeten Virusarten im embryonierten Hühnerei gezüchtet und wie das Virus N gewonnen und aufgearbeitet. Vorversuche haben gezeigt, daß sie im allgemeinen durch 30 Minuten langes Erhitzen auf 56° C ohne nennenswerten Abfall der hämagglutinierenden Aktivität zum Indikatorvirus überführt werden können. Für die Untersuchungen verwendeten wir sowohl aktives als auch Indikatorvirus und nicht erhitztes sowie für 30 Minuten auf 90° C erhitztes Kälberserum. Die Hämagglutinationshemmungsreaktion wurde wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben, durchgeführt. Die

Tabelle 8

Plaquebildungsvermögen der aviären Influenzastämme auf Hühnerfibroblasten

Virusstamm	Hämagglutinierende Einheiten des Ausgangsmaterials	Zahl der Plaques pro Verdünnung							Plaquebildende Einheiten per ml
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸		
A/Turk/Eng/66 "Wannop"	250	0	0	0	0	0	0	0	
KP "Dutch"	250	+	+	300	43/44	2/1	1/0	2,15 x 10 ⁸	
A/Turk/Mass/65	32	0	0	0	0	0	0	0	
A/Turk/Eng/63 "Langham"	250	+	+	+	54/41	6/3	0	2,2 x 10 ⁸	
A/Ch/Scotl./59 "Wilson"	16	0	0	0	0	0	0	0	
A/Turk/Can/63 "Wilnot"	250	0	0	0	0	0	0	0	
KP "Brescia"	250	+	+	64/112	5/15	0/1	0	4,5 x 10 ⁷	
A/Winnor/65	8	0	0	0	0	0	0	0	
Tern/SA/61	250	+	+	60/0	6/18	0/3	0	3 x 10 ⁷	
KP "Rostock"	250	+	+	+	99/-	13/15	1/0	5 x 10 ³	

+ = konfluierende Plaques

Versuchsergebnisse sind in Tab. 7 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß der im Kälberserum enthaltene Inhibitor nur die hämagglutinierende Fähigkeit des Virus N und des Influenza-Stammes A/Turk/England/66, Wannop hemmt. Die Hämagglutination der anderen aviären Influenzastämme wurde dagegen nicht beeinflusst. Wie beim Virus N wurde auch beim Stamm A/Turk/Eng/66 nicht die Hämagglutination von aktivem Virus inhibiert. Auch nahm gegenüber beiden Stämmen die Inhibitionsaktivität durch Erhitzen des Kälberserums zu. Es ist daher anzunehmen, daß beide Virusarten in ihrer hämagglutinierenden Aktivität durch den gleichen Inhibitor beeinflusst werden.

Bei den Untersuchungen hat sich gezeigt, daß die verwendeten Erythrozyten einen Einfluß auf die Hämagglutinationshemmung ausüben können. So gaben Erythrozyten bestimmter Hähne bei der Reaktion mit den aviären Influenzastämmen KP-Dutch, Tern/SA/61 und A/Turk/Eng/63 eine inkomplette Hemmreaktion. Bei Verwendung von Erythrozyten anderer Hähne war die Reaktion immer negativ. Beim Virus N konnte eine derartige Abhängigkeit der Reaktion von den verwendeten Erythrozyten nicht festgestellt werden. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden daher die entsprechenden Versuche immer mit dem Blut derselben Tiere durchgeführt, die eindeutige Ergebnisse erwarten ließen.

4. Versuche zur Identifizierung der Inhibitor-sensitiven Viruskomponente

Es muß davon ausgegangen werden, daß die für die Adsorption der Viruspartikel an Zelloberflächen und damit auch für die Hämagglutination verantwortlichen Viruskomponenten an der Oberfläche der Viria lokalisiert sind. Eine Beeinflussung dieser Vorgänge, wie sie mit dem Serum-inhibitor möglich ist, sollte daher auch über Komponenten der Virusoberfläche gehen. Nach den bisher vorliegenden Erkenntnissen sind, wie bereits ausgeführt, an der Struktur der Virusaußenhülle virus- und wirtsspezifische Komponenten beteiligt. Wir haben im folgenden zu eruieren versucht, mit welcher dieser Komponenten der Serum-inhibitor reagiert.

a) Neuraminidase

Der Neuraminidase wird allgemein eine wichtige Rolle bei den frühen Wechselwirkungen zwischen Myxoviren und Zelloberflächen zugeschrieben. So interpretiert Drzeniek (1970) die z.Zt. vorliegenden Untersuchungsergebnisse so, daß die reversible Bindung der Myxoviren an Zelloberflächen auf einer "echten Enzym-Substratbindung" beruht. Es erscheint also a priori naheliegend, daß die Neuraminidase die mit dem Serum-inhibitor reagierende Komponente darstellt. Dies um so mehr, als der Serum-inhibitor alle

Eigenschaften eines sogenannten Myxovirusrezeptors besitzt und wie dieser durch Neuraminidase zerstört wird. Gegen diese Annahme sprechen aber bereits von uns dargestellte Befunde. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß die Aktivität des Enzyms des aviären Influenzastammes KP/Dutch durch Antiserum gegen Virus N gehemmt wird, ohne daß jedoch seine Hämagglutination durch den Seruminhibitor beeinflusst werden kann. Auf der anderen Seite verhielt sich der Stamm A/Turk/Eng./66/Wannop in seinem Verhalten gegenüber dem Seruminhibitor analog dem Virus N, d.h. seine Hämagglutination wurde wie die des Virus N durch Kälberserum inhibiert. In diesem Falle unterscheiden sich jedoch beide Enzyme in ihrer Antigenstruktur. Wir versuchten, dieses Ergebnis durch einen weiteren Versuch zu erhärten.

Becht und Drzeniek (1968) haben nachgewiesen, daß die Myxovirus-Neuraminidase durch Kongorot hemmbar ist. Diese Hemmung der Enzymaktivität bot sich zur Klärung der Frage an, ob der Virus-Neuraminidase eine Bedeutung für die Reaktion des Virus mit dem Seruminhibitor zukommt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß das Enzym von Virus N durch 6×10^5 M Kongorot zu etwa 70% inhibiert werden kann. Bei diesem Versuch wurden steigende Konzentrationen von Kongorot mit einer gleichen Menge partiell gereinigtem Virus N gemischt. Das Virus

war so eingestellt, daß es in 15 Minuten bei 37° C etwa 10 µg Sialinsäure aus Rindersialolactose abspaltet. Die Hemmung wurde aus der Differenz der Enzymaktivität zwischen den Testansätzen und den Kontrollen ermittelt.

Im eigentlichen Versuchsansatz wurde das Kälberserum nach Potenzen von 2 in physiologischer Kochsalzlösung, die 100 µg Kongorot/ml enthielt, verdünnt, und anschließend eine gleiche Menge Virus N zugegeben, das im gleichen Lösungsmittel auf 3 hämagglutinationshemmende Dosen eingestellt war. Nach 30 Minuten Stehen bei Raumtemperatur wurden dem Gemisch Erythrozyten zugegeben, die ebenfalls in physiologischer Kochsalzlösung, der 100 µg Kongorot/ml zugegeben war, aufgenommen wurden. Die Reaktion wurde nach 45 Minuten abgelesen. Bei drei in der gleichen Weise durchgeführten Versuchen konnte durch den Zusatz von Kongorot, also durch eine Hemmung der Neuraminidase, keine Beeinflussung der Hämagglutinationshemmung durch den Seruminhibitor festgestellt werden.

Nachdem die durchgeführten Versuche es als wenig wahrscheinlich erscheinen lassen, daß der Neuraminidase eine wesentliche Funktion bei der Reaktion des Seruminhibitors mit dem Virus N zukommt, erhebt sich die Frage, warum nur Indikatorvirus durch den Seruminhibitor beeinflusst wird. Allgemein wird dabei angenommen, daß durch die Be-

handlung bei 56°C die Enzymaktivität weitgehend zerstört wird, ohne daß die Struktur des Enzyms, also seine Fähigkeit zur Bindung mit dem Substrat, beeinflußt wird. Wir prüften im folgenden, ob diese Annahme richtig ist. Dazu wurde eine partiell gereinigte Viruspräparation, die 32 000 hämagglutinierende Einheiten enthielt, für 30 Minuten bei 56°C gehalten und anschließend die Enzymaktivität bestimmt. Im Vergleich mit der nicht erhitzten Kontrolle nahm die Enzymaktivität durch die Erhitzung nicht mehr ab als die Hämagglutinationsaktivität. Die Inaktivierung des Enzyms kann also nicht für die Reaktion verantwortlich sein (Tab. 9).

b) Hämagglutinin

Neben der Neuraminidase ist noch die für die Hämagglutination der Influenzaviren verantwortliche Komponente, das sogenannte Hämagglutinin, an der Virusoberfläche gelegen. Die in der letzten Zeit publizierten Untersuchungen über die Struktur der Influenzaviren haben gezeigt, daß Neuraminidase und Hämagglutinin zwei unterschiedliche Viruskomponenten sind und daß das enzymfreie Hämagglutinin allein in der Lage ist, eine Hämagglutination auszubilden (vergl. Rott, Drzeniek u. Frank, 1970). Es ist also durchaus denkbar, daß auch die für die Hämagglutination verantwortliche Viruskomponente mit dem Serum-inhibitor direkt

Tabelle 9

Eigenschaften von hämagglutinierenden Strukturen des Virus N

Hämagglutinin	Neuraminidasegehalt in µg pro ml	Hämagglutinationstiter*	Hämagglutinationshemmungstiter gegen Kälberserum 30 Min. 90° C
natives Virus N Konzentrat	2 850	30 000	< 8
Indikatorvirus N Konzentrat	53,7	500	16 000
Äther-Tween-Hämagglutinin aus Indikatorvirus N Konzentrat	7,5	128	< 8

* angegeben sind die reziproken Hämagglutinationshemmungstiter

reagiert. Um das zu prüfen, haben wir zunächst aus technischen Gründen das sogenannte Hämagglutinin mit Hilfe von Äther und Tween 80 nach der von Rott (1965) beschriebenen Methode gewonnen. Dieses Hämagglutinin stellt ein Fragment der Virushülle dar, das neben der hämagglutinierenden noch Enzymaktivität besitzt. Die Hämagglutination dieser Präparation wurde durch Kälberserum nicht beeinflusst. Auch dann nicht, wenn das Hämagglutinin für 30 Minuten auf 56° C erhitzt wurde (Indikatorzustand).

Damit dürfte klar sein, daß auch die das hämagglutinierende Prinzip tragende Komponente des Virus N nicht für die Reaktion mit dem im Kälberserum vorhandenen Serum-inhibitor verantwortlich ist.

c) Normalkomponente

Nachdem keine Hinweise dafür gefunden werden konnten, daß virusspezifische Komponenten der Virusoberfläche mit dem Serum-inhibitor reagieren, mußte geprüft werden, ob wirtsspezifische Komponenten für diese Reaktion in Frage kommen.

Per definitionem muß die Zusammensetzung der in die Virusaußenhülle inkorporierten wirtsspezifischen Komponenten abhängig sein von den in der Wirtszelle vorliegenden

Strukturen. So konnten Rott und Mitarbeiter (1966) nachweisen, daß lipidhaltige Viren, die z.B. im embryonierten Hühnerei gezüchtet wurden, wie die Zellmembranen des Wirtes u.a. Blutgruppen A-Substanz, Forssman- und Mononucleose-Antigene enthalten. Werden diese Viren dagegen im embryonierten Entenei zur Vermehrung gebracht, in denen diese Antigene nicht nachgewiesen werden können, so lassen sich diese auch nicht im Virus erfassen. Durch einen einfachen Wirtswechsel lassen sich folglich die Antigenstruktur der Virushülle und damit sicherlich auch ihre Eigenschaften modifizieren.

Wir haben dementsprechend zunächst versucht, ob sich in Enteneier gezüchtetes Virus N in seinen hämagglutinierenden Eigenschaften durch den Serum-inhibitor genauso beeinflussen läßt wie solches, das aus Hühnereiern gewonnen wurde.

Das war tatsächlich der Fall. Es konnten nämlich keine Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit zwischen dem Serum-inhibitor und Viren aus Enten- bzw. Hühnereiern festgestellt werden. Zumindest die von Rott und Mitarbeitern (1966) erfaßten Blutgruppen-, Forssman- und Mononucleose-Antigene können also nicht für die geprüfte Reaktion verantwortlich sein.

Becht (unveröffentlichte Befunde) konnte mit Hilfe von Nonidet NP 40 (einem nicht ionischen Detergens der Fa. Shell AG) aus Influenzavirus-infizierten Eihäuten eine relativ niedermolekulare hämagglutinierende Substanz isolieren, deren hämagglutinierende Fähigkeit nicht-viruspezifischer Art ist. Es wurde nun von uns geprüft, ob sich eine entsprechende Substanz aus nichtinfizierten Eihäuten gewinnen läßt. Hierzu wurden Chorioallantoismembranen von ca. 100 Hühnereiern, die 12 Tage bei 37° C vorbebrütet waren, sorgfältig mit 0,01 M Phosphatpufferlösung, pH 7,2, gewaschen, dann in 100 ml Phosphatpufferlösung aufgenommen, 3 - 4 Minuten mit dem Ultra-Turrax hochtourig homogenisiert und nach Zusatz von 0,5 ml Nonidet weitere 3 - 4 Minuten niedertourig durchmischt. Nach 10 Minuten langem Zentrifugieren bei 2200 g wurde der Überstand einer nochmaligen Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei einem Leistungsindex von π 15 unterworfen. Der so gewonnene Überstand besaß die gleichen hämagglutinierenden Eigenschaften wie eine Parallelaufarbeitung aus Virus N-infizierten Chorioallantoismembranen. Die hämagglutinierende Eigenschaft dieser Präparationen ließ sich, wie aus Tab. 10 hervorgeht, mit virusspezifischem Antiserum wie auch mit Normalseren verschiedener Provinienz hemmen. Die Hemmtiter waren in der gleichen Größenordnung. Interessanterweise scheint auch hier die Hemmwirkung zumindest des Rinderserums an die α_2 -Globulinfraction gebunden zu sein. Rinderserumalbumin und die γ -Globulinfraction

Tabelle 10

Hemmung des "Nonidet-Hämagglutinins" durch Seren verschiedener Herkunft und Serumfraktionen

Serum bzw. Serumfraktionen	Hämagglutinationshemmungstiter*	
	Hämagglutinin aus nicht-infizierten Chorioallantoismembranen	Hämagglutinin aus mit Virus N infizierten Chorioallantoismembranen
Serum (Kalb), nicht erhitzt	1 000	1 000
Serum (Kalb), 30' 90° C	2 000	2 000
alpha-Globulin (Rind), nicht erhitzt	1 000	1 000
alpha-Globulin (Rind), 30' 90° C	2 000	2 000
gamma-Globulin (Rind), nicht erhitzt	<8	<8
gamma-Globulin (Rind), 30' 90° C	<8	<8
Albumin (Rind), nicht erhitzt	<8	<8
Albumin (Rind), 30' 90° C	<8	<8
Serum (Mensch), nicht erhitzt	500	1 000
Serum (Mensch), 30' 90° C	1 000	2 000
Serum (Pferd), nicht erhitzt	1 000	n.t.
Serum (Pferd), 30' 90° C	2 000	n.t.
Serum (Kaninchen), nicht erhitzt	2 000	1 000
Serum (Huhn), nicht erhitzt	2 000	2 000

n.t. = nicht getestet

* angegeben sind die reziproken Hämagglutinationshemmungstiter

besaßen keine hämagglutinationshemmende Aktivität.

Um auszuschließen, daß die gefundene nichtvirusspezifische Hämagglutination kein Nonidet-Effekt ist, wurde zu einer 2%igen Rinderserumalbumin-Lösung Nonidet im gleichen Verhältnis wie im Hauptversuch gegeben und die Mischung im Ultra-Turrax homogenisiert und entsprechend den Angaben im Hauptversuch zentrifugiert. Die so gewonnenen Überstände ergaben keine Hämagglutinationsreaktion.

Mit der gleichen Methode war es uns auch möglich, eine analoge hämagglutinierende Substanz aus partiell gereinigtem Virus N zu gewinnen. Die Hämagglutination dieser Substanz konnte ebenfalls mit Hilfe von Normalseren gehemmt werden. Es ist also naheliegend, anzunehmen, daß eine wirtsspezifische Komponente für die Reaktion mit dem Seruminhäbitor in Frage kommt oder zumindest daran beteiligt ist.

An der Struktur des nichtspezifischen Hämagglutinins scheinen Polysaccharide beteiligt zu sein, da es durch 30 Minuten langes Erhitzen auf 90° C nicht zerstört wird. Weitere Versuche sind noch notwendig, um die Natur dieser Substanz aufzuklären.

VI. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Bindung infektiöser Viruspartikel an Zelloberflächen stellt den ersten spezifischen Schritt im Vermehrungszyklus der Viren dar. Ihre Spezifität determiniert den Zelltropismus. Über die Natur dieser Bindung ist besonders bei animalen Viren noch wenig bekannt. Bei Bakteriophagen wurde gezeigt, daß die Virusempfänglichkeit einer Zelle auf der Anwesenheit bestimmter Rezeptoren an der Zelloberfläche beruht (Weidel, 1958). Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß animale Viren mit entsprechenden Rezeptoren eine spezifische Bindung eingehen. Tatsächlich konnten aus Zelloberflächen, Körpersekreten und Seren Substanzen isoliert werden, die unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, mit Myxoviren so zu reagieren, daß ihre Anheftung an Zelloberflächen verhindert wird. Bei diesen sogenannten Myxovirusrezeptoren handelt es sich in der Regel um Glycoproteine, die in terminaler Position Sialinsäure enthalten. Es wird allgemein angenommen (vergl. Drzeniek, 1970), daß es zwischen diesem Rezeptor und der an der Oberfläche der Myxoviren gelegenen Neuraminidase zu einer Enzym-Substratbindung kommt. Trifft diese Annahme zu, so ist zu fordern, daß die Neuraminidase die für die Adsorption der Myxoviren an ihre Wirtszellen entscheidende Komponente darstellt. Das scheint aber nach den von uns durchgeführten Untersuchungen nicht der Fall zu sein.

Wir benutzten für unsere Versuche den von Berg und Babiker (1969) erfaßten in Kälberseren vorkommenden Inhibitor, der zu den sogenannten α -Inhibitoren gehört. Er ist, wie wir zeigen konnten, wie die übrigen α -Inhibitoren mit der α_2 -Fraktion der Serumglobuline assoziiert. Es kann daher nicht daran gezweifelt werden, daß es sich bei diesem Seruminhibitor um einen "echten Myxovirusrezeptor" handelt. Er scheint insofern spezifisch zu sein, als er von den von uns untersuchten aviären Influenzaviren neben dem Virus N nur mit dem KP-Stamm "Dutch" reagiert, d.h. die Hämagglutination dieser beiden Virusstämme hemmt, wenn sie sich im Indikatorzustand befinden. Wie Antigen-Analysen ergaben, ist die antigene Feinstruktur der Neuraminidase dieser beiden Stämme jedoch unterschiedlich. Da zumindest eine antigeneterminante Gruppe des Enzyms mit seinem aktiven Zentrum übereinstimmt (Becht u. Rott, persönliche Mitteilung), kann es sich bei den Neuraminidasen beider Stämme nicht um identische Enzyme handeln. Weiterhin ließ sich die Reaktion dieser Virusstämme mit dem Seruminhibitor nicht beeinflussen, wenn die Enzymaktivität durch Kongorot gehemmt wird. Schließlich konnte die Auffassung korrigiert werden, daß beim Indikatorvirus, d.h. einem für 30 Minuten auf 56°C erhitztem Virus, das allein mit dem Seruminhibitor reagiert, die Neuraminidase zerstört ist. Sie nimmt nur um etwa denselben Grad ab wie die

Hämagglutinationsaktivität. Im eigentlichen Ansatz liegt daher immer dieselbe Enzymaktivität vor. Eine Funktion der Neuraminidase bei der Reaktion zwischen Serum-inhibitor und Virus-Neuraminidase kann daher, zumindest in dem untersuchten System, ausgeschlossen werden.

Ähnliches gilt aber auch für die zweite an der Virusoberfläche lokalisierte virusspezifische Komponente, das Hämagglutinin, dem, wie schon aus dem Namen hervorgeht, für die Bindung des Virus an Zelloberflächen offensichtlich eine Bedeutung zukommt. Es kann jedoch für die Reaktion mit dem Serum-inhibitor insofern nicht in Betracht kommen, als das durch Spaltung der Viruspartikel mit Äther-Tween erhaltene Hämagglutinin nicht beeinflußt wird. Für diesen Befund mag auch die Feststellung sprechen, daß die Hämagglutination des Virusstammes KP "Dutch" ebenso wie die des Virus N durch den Serum-inhibitor gehemmt wird, beide aber eine unterschiedliche Antigenstruktur in ihren Hämagglutininen besitzen. Das Hämagglutinin muß daher mit anderen Strukturen der Zelloberfläche reagieren als mit dem sogenannten Myxovirusrezeptor.

Überraschenderweise ließ sich jedoch mit einem nicht-ionischen Detergens sowohl aus intakten Influenzaviruspartikeln als auch aus infizierten und sogar aus nicht-

infizierten Chorioallantoismembranen des embryonierten Hühnereies eine hämagglutinierende Substanz isolieren, die offensichtlich keine virusspezifische Eigenschaft besitzt. Ihre Hämagglutination konnte nämlich durch Normalseren verschiedener Herkunft gehemmt werden. Wie die Hämagglutination des Virus N wird auch diejenige der durch Nonidet erhaltenen Substanz (Nonidet-Hämagglutinin) nicht durch Serumalbumin und gamma-Globulin, sondern durch die alpha-Fraktion der Serumglobuline inhibiert. Es kann daher angenommen werden, daß es sich bei der Hemmung der Hämagglutination des Virus N und des Nonidet-Hämagglutinins durch den Serum-inhibitor um eine analoge Reaktion handelt, und daß das oder Teile des wirtsspezifischen Nonidet-Hämagglutinins die eine für die Reaktion notwendige Komponente ist.

Die erhaltenen Befunde und die aufgestellte Hypothese eröffnen einen großen Fragenkomplex, der bis jetzt jedoch nur spekulativ beantwortet werden kann. So erhebt sich einmal die Frage, warum die Hämagglutination, die ja eine virusspezifische Reaktion ist, durch den Serum-inhibitor gehemmt wird, obwohl die mit dem Inhibitor reagierende Substanz wirtsspezifischer Natur sein soll. Sind sich an der Oberfläche der Viruspartikel diese beiden Komponenten benachbart, so kann nach Bindung des Inhibitors an die wirtsspezifische Komponente das Hämagglutinin leicht -

und unspezifisch - beeinflußt werden. Dies um so mehr, je größer der Seruminhibitor ist. Tatsächlich konnte von Berg und Babiker (1969) und von uns auch gezeigt werden, daß die Inhibitoraktivität nach Erhitzen ansteigt, ein Befund, der als eine Hitzepolymerisation des Inhibitor-moleküls interpretiert wird. Das könnte bedeuten, daß ein polymerer Inhibitor, wenn er an eine wirtsspezifische Komponente am Viruspartikel gebunden wird, einen relativ großen Abschnitt an der Virusoberfläche abzudecken in der Lage ist. Für die Hemmung der Häm-agglutination wäre demnach die sterische Anordnung der wirtsspezifischen Komponente zum Hämagglutinin ausschlaggebend. Weiterhin ist zu fordern, daß diese mit dem Inhibitor reagierende Komponente an der Virusoberfläche exponieren muß. Die Struktur der Virusoberfläche wird ohne Zweifel vom genetischen Material des Virus determiniert. Es überrascht daher nicht, daß eine an sich nicht virusspezifische Reaktion - nämlich die Bindung einer wirtsspezifischen Komponente an einen in Normalserum vorkommenden Inhibitor - virusspezifischen Charakter annehmen kann. Das bedeutet, daß die Reaktion des Virus N mit dem im Kälberserum vorkommenden α -Inhibitor nur insofern virusspezifisch ist als die virusspezifischen Komponenten der Virusaußenhülle die sterische Anordnung der mit dem Inhibitor reagierenden wirtsspezifischen Substanz determiniert. Das träfe mutatis

mutandis auch für die Reaktion anderer Seruminhibitoren mit anderen Myxoviren zu.

Ist der Seruminhibitor wirklich ein Myxovirusrezeptor, so könnte neben dem Hämagglutinin eine wirtsspezifische Komponente für die Adsorption der Viruspartikel an Zelloberflächen und damit auch für den Zelltropismus der Viruspartikel von entscheidender Bedeutung sein. Die Erklärung der hier angerissenen Probleme könnte neue Erkenntnisse über die frühen Wechselwirkungen zwischen Virus und Zelle bringen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Der von Berg und Babiker (1969) erfaßte, mit dem Virus N reagierende α -Inhibitor läßt sich in Seren verschiedener Tierarten nachweisen. Er ist an die α_2 -Fraktion der Serumglobuline gebunden. Von den untersuchten aviären Influenzaviren vermag neben dem Virus N nur der Stamm A/Turk/Eng/66 mit dem Inhibitor zu reagieren. Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Virus-Neuraminidase oder das Hämagglutinin für die Reaktion mit dem Seruminhibitor verantwortlich sind. Es spricht vielmehr einiges dafür, daß sie durch eine an der Virusoberfläche gelegene wirtsspezifische Komponente ausgelöst wird. Die Bedeutung der erhaltenen Befunde für das Verständnis der Reaktion der Seruminhibitoren der Myxoviren und der frühen Wechselwirkung zwischen Myxoviren und Zellen wird diskutiert.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aminoff, D. (1961)

Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids.

Biochem. J. 81, 384.

2. Babiker, H. A. und R. Rott (1968)

Biologische Eigenschaften des Virus N.

I. Plaquetest für das Virus N in Hühnernierenzellen.

Zbl. Vet. Med. B15, 353.

3. Becht, H. und R. Drzeniek (1968)

The effect of azo dyes on myxovirus neuraminidase and on virus multiplication.

J. gen. Virol. 2, 261.

4. Berg, E. und H. A. Babiker (1969)

Biologische Eigenschaften des Virus N.

II. Ein Serum-inhibitor des Virus N.

Zbl. Vet. Med. B16, 637.

5. Biddle, F. und K. F. Shortridge (1967)

Immunological cross-reactions of influenza virus inhibitors.

Brit. J. exp. Path. 48, 285.

6. Cohen, A. und G. Belyavin (1959)

Hemagglutination inhibition of Asian influenza viruses. A new pattern of response.

Virology 7, 59.

7. Cohen, A., S. E. Newland und F. Biddle (1963a)
Inhibition of influenza virus haemagglutination:
A difference of behavior in sera from a single
species.
Virology 20, 518.
8. Davenport, F. M., R. Rott und W. Schäfer (1960)
Physical and biological properties of influenza virus
components obtained after ether treatment.
J. exp. Med. 112, 765.
9. Drzeniek, R. (1970)
Wechselwirkung zwischen Myxoviren und Zelloberflächen.
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 155, 315 u. 156, 1.
10. Drzeniek, R., J. T. Seto und R. Rott (1966).
Characterization of neuraminidases from myxoviruses.
Biochim. Biophys. Acta 128, 547.
11. Dulbecco, R. und M. Vogt (1954)
Plaque formation and isolation of pure lines with
poliomyelitis viruses.
J. exp. Med. 99, 167.
12. Fazekas de St. Groth, S. und A. Gottschalk (1963).
Studies on glycoproteins.
10. Equilibrium measurements on influenza virus
glycoprotein systems.
Biochim. Biophys. Acta 78, 248.

13. Giebler, P. (1958)

Definierung und Auswertung präparativer Ultrazentrifugierungen mit Hilfe des "Performance Index (pi)".

Z. Naturforsch. 13b, 238.

14. Gottschalk, A. (1960)

The chemistry and biology of sialic acids and related substances.

Cambridge University Press, London.

15. Gottschalk, A. (1964)

The molecular structure of ovine submaxillary gland glycoprotein.

Proc. Internat. Conf. "Salivary glands and their secretions". Washington Pergamon Press 351 - 364.

16. Kozinski, A. W. und E. Mikulaszek (1951)

The purification of an influenza virus inhibitor from egg white. General properties of the inhibitor.

Med. Dosw. Microbiol. Warsaw 3, 242.

17. Kraus, W. und W. Schäfer (1963)

Apparatur zur Herstellung von primären Kulturen animaler Zellen.

Zbl. Vet. Med. B10, 394.

18. Křižanová, O. und V. Rathová (1969)

Serum inhibitors of myxoviruses.

Current Topics 47, 125.

19. Križanová, O., V. Rathová, D. Kočísková und J. Szantó (1963)
- The purification and some properties of the beta-inhibitor from bovine serum.
- Bratisl. lek. Listy 43, 22.
20. Križanová, O. und F. Sokol (1966)
- Purification of bovine serum beta inhibitor by chromatographic methods and its reaction with A1 influenza virus.
- Acta virol. 10, 35.
21. Lief, F. S., A. Fabiyi und W. Henle (1958)
- Antigenic analyses of influenza viruses by complement fixation.
1. The production of antibodies to the soluble antigen in guinea pigs.
- J. Immunol. 80, 53.
22. Pereira, H. G. (1969)
- Antigenic variation in influenza viruses in man and animals.
- Proc. Royal Soc. Med. 62, 43.
23. Pereira, H. G., G. Lang, O. M. Olesiuk, G. H. Snoeyenbos, D. H. Roberts und B. C. Easterday (1966)
- New antigenic variants of avian influenza A viruses.
- Bull. Org. mond. Sante Bull. Wld. Hlth. Org. 35, 799.
24. Rinaldi, A., L. Nardelli, H. G. Pereira, G. C. Mandelli, R. Gandolfi und G. Cervio (1967a)
- Focolaio di influenza A nel fagiano (*Phasianus colchicus* L.).
21. Convegno della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie Senigallia 21, 867.

25. Rinaldi, A., L. Nardelli, H. G. Pereira, G. C. Mandelli, D. Cessi und G. Cervio (1967b)
Focolai di influenza A nella quaglia domestica (Coturnix coturnix japonica).
21. Convegno della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie Senegallia 21, 872.
26. Rinaldi, A., L. Nardelli, H. G. Pereira, G. C. Mandelli, G. Cervio und A. Valeri (1968a)
Isolamento di virus del tipo influenza A dal pollo.
Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie 22, 782.
27. Rinaldi, A., L. Nardelli, H. G. Pereira, G. C. Mandelli, G. Cervio und R. Gandolfi (1968b)
Focolaio di influenza A nella coturnice orientale (Alectoris chukar).
Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie 22, 777.
28. Rott, R. (1965)
Untersuchungen über die Feinstruktur des infektiösen Partikels der Newcastle Disease und über die neben ihm auftretenden nichtinfektiösen, virusspezifischen Einheiten.
Zbl. Vet. Med. B12, 74.
29. Rott, R., R. Drzeniek und H. Frank (1970)
On the structure of influenza viruses.
In: The Biology of Large RNA-Viruses.
Herausgegeben von R. D. Barry und B. W. J. Mahy.
Academic Press, New York, London.
30. Rott, R., R. Drzeniek, M. S. Saber und E. Reichert (1966)
Blood group substances, Forssman- and mononucleosis antigens in lipid-containing RNA viruses.
Arch. ges. Virusforsch. 3, 273.

31. Rott, R. und W. Schäfer (1960)
Physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften
des Virus N und seine Beziehungen zur Influenza A-
Untergruppe der Myxoviren.
Zbl. Vet. Med. B7, 237.
32. Schäfer, W., Th. Zimmermann und H. Schuster (1959)
Inaktivierung verschiedener menschen- und tierpatho-
gener Virusarten sowie des Tabakmosaik-Virus durch
salpetrige Säure.
Z. Naturforsch. 14b, 632.
33. Shimojo, H., A. Sugiura, J. Akao und Ch. Enomoto (1958)
Studies of a non-specific hemagglutination inhibitor
of influenza A(Asian)57 virus.
Bull. Inst. Publ. Health 7, 219.
34. Springer, G. F. (1967)
Human MN glycoproteins: Dependence of blood-group and
anti-influenza virus activities on their molecular
size.
Biochem. biophys. Res. Commun. 28, 510.
35. Stone, J. D. (1949)
Inhibition of influenza virus hemagglutination by
mucoids.
II. Differential behaviour of mucoid inhibitors with
indicator viruses.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 27, 557.
36. Styk, B. (1955)
Non-specific inhibitors in normal rat serum for the
influenza C type virus.
Fol. biol. (Praha) 1, 207.

37. Weidel, W. (1958)

Bacterial viruses (with particular reference to adsorption/penetration).

Ann. Rev. Microbiol. 12, 27.

Herrn Prof. Dr. R. Rott danke ich für die
Überlassung des Themas meiner Doktorar-
beit und für seine großzügige menschliche
und wissenschaftliche Unterstützung. Mein
Dank gilt weiterhin allen Angehörigen des
Instituts für ihre vielseitige Hilfe.

L e b e n s l a u f

13.3.1939	geboren in Niebüll, Schleswig-Holstein
1946 - 51	Grundschule in Niebüll
1951 - 61	Friedrich-Paulsen-Gymnasium in Niebüll
1961	Reifeprüfung
Sommersemester 1961 - Wintersemester 61/62	Studium der Rechtswissenschaft an der Freien Universität Berlin und der Universität Hamburg
Sommersemester 1962 - Wintersemester 63/64	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
Frühjahr 1964	Tierärztliche Vorprüfung an der Freien Universität Berlin
Sommersemester 1964 u. Wintersemester 64/65	Fortsetzung des Studiums der Veterinär- medizin an der Justus Liebig-Universität Gießen
bis Sommersemester 66	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
Januar 1967	Tierärztliche Prüfung an der Freien Universität Berlin
1967 - 1968	Veterinärpraktikantenzeit bei Herrn Dr. Middendorf in Heessen/Westfalen und Praxisvertretungen
15.11.1967	Approbation als Tierarzt
ab 1968	Vorbereitung zur Dissertation bei den Herren Professoren Dr. H. Bartels und Dr. R. Rott
ab 1.4.1968 - 31.10.1968	Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus Liebig-Universität Gießen
ab 15.5.1969	Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle im Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen
April 1962	Eheschließung mit Ingrid Reimann. Wir haben zwei Kinder im Alter von 6 und 8 Jahren.

Verzeichnis

1911	Verzeichnis der ...
1912	Verzeichnis der ...
1913	Verzeichnis der ...
1914	Verzeichnis der ...
1915	Verzeichnis der ...
1916	Verzeichnis der ...
1917	Verzeichnis der ...
1918	Verzeichnis der ...
1919	Verzeichnis der ...
1920	Verzeichnis der ...
1921	Verzeichnis der ...
1922	Verzeichnis der ...
1923	Verzeichnis der ...
1924	Verzeichnis der ...
1925	Verzeichnis der ...
1926	Verzeichnis der ...
1927	Verzeichnis der ...
1928	Verzeichnis der ...
1929	Verzeichnis der ...
1930	Verzeichnis der ...
1931	Verzeichnis der ...
1932	Verzeichnis der ...
1933	Verzeichnis der ...
1934	Verzeichnis der ...
1935	Verzeichnis der ...
1936	Verzeichnis der ...
1937	Verzeichnis der ...
1938	Verzeichnis der ...
1939	Verzeichnis der ...
1940	Verzeichnis der ...
1941	Verzeichnis der ...
1942	Verzeichnis der ...
1943	Verzeichnis der ...
1944	Verzeichnis der ...
1945	Verzeichnis der ...
1946	Verzeichnis der ...
1947	Verzeichnis der ...
1948	Verzeichnis der ...
1949	Verzeichnis der ...
1950	Verzeichnis der ...
1951	Verzeichnis der ...
1952	Verzeichnis der ...
1953	Verzeichnis der ...
1954	Verzeichnis der ...
1955	Verzeichnis der ...
1956	Verzeichnis der ...
1957	Verzeichnis der ...
1958	Verzeichnis der ...
1959	Verzeichnis der ...
1960	Verzeichnis der ...
1961	Verzeichnis der ...
1962	Verzeichnis der ...
1963	Verzeichnis der ...
1964	Verzeichnis der ...
1965	Verzeichnis der ...
1966	Verzeichnis der ...
1967	Verzeichnis der ...
1968	Verzeichnis der ...
1969	Verzeichnis der ...
1970	Verzeichnis der ...
1971	Verzeichnis der ...
1972	Verzeichnis der ...
1973	Verzeichnis der ...
1974	Verzeichnis der ...
1975	Verzeichnis der ...
1976	Verzeichnis der ...
1977	Verzeichnis der ...
1978	Verzeichnis der ...
1979	Verzeichnis der ...
1980	Verzeichnis der ...
1981	Verzeichnis der ...
1982	Verzeichnis der ...
1983	Verzeichnis der ...
1984	Verzeichnis der ...
1985	Verzeichnis der ...
1986	Verzeichnis der ...
1987	Verzeichnis der ...
1988	Verzeichnis der ...
1989	Verzeichnis der ...
1990	Verzeichnis der ...
1991	Verzeichnis der ...
1992	Verzeichnis der ...
1993	Verzeichnis der ...
1994	Verzeichnis der ...
1995	Verzeichnis der ...
1996	Verzeichnis der ...
1997	Verzeichnis der ...
1998	Verzeichnis der ...
1999	Verzeichnis der ...
2000	Verzeichnis der ...

